

不同孵化组合对红耳龟胚胎发育的影响

朱天生, 王 明, 陈栋芸

海南师范大学生命科学学院, 海南 海口
Email: 1772016115@qq.com

收稿日期: 2021年2月28日; 录用日期: 2021年3月8日; 发布日期: 2021年3月29日

摘 要

为探究陆生龟类胚胎间是否存在信息交流, 本实验以红耳龟(*Trachemys scripta elegans*)为研究对象, 将150枚龟卵随机均分为两组, 分别置于27℃和31℃下孵化, 分别在孵化15 d (第一个1/4孵化期)、30 d (第二个1/4孵化期)后, 从I、II两组各取17枚卵组成第III、第IV组在27℃下混合孵化, 检测各组胚胎的心率、孵化期及孵化率。结果显示: 第III组整体孵化率和追溯卵的首次分组情况后孵化率都领先于其他各组, 第IV组在追溯了卵的第二次分组情况后孵化率也较第I、II组有一定的上升。第I组破壳高峰期在第95~98 d, 第II组破壳高峰期在第63~64 d, 而第III、IV组破壳时间在I、II组之间。与第I组胚胎心率差异显著性比较可知, 第III组和第IV组组合中的第I组的胚胎心率进程明显加快, 说明第III、IV两组内的胚胎能够互相影响, 推测可能通过信息交流促使发育进度不同的胚胎趋于同步孵化, 有助于降低稚龟破壳初期被天敌捕食的比率。

关键词

红耳龟, 孵化, 信息交流, 心率

Effects of Different Hatching Combinations on Embryonic Development of Red-Eared Tortoise

Tiansheng Zhu, Ming Wang, Dongyun Chen

College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou Hainan
Email: 1772016115@qq.com

Received: Feb. 28th, 2021; accepted: Mar. 8th, 2021; published: Mar. 29th, 2021

Abstract

To explore whether information exchange existed between terrestrial turtle embryos, this experiment took the red-eared turtle (*Trachemys scripta elegans*) as the research object, and 150 turtle eggs were randomly and equally divided into two groups and incubated at 27°C and 31°C, respectively. After incubation for 15 d (the first quarter incubation period), and 30 d (after the second quarter incubation period), 17 eggs were collected from each of the two groups I and II to form group III and group IV, and then they were mixed and incubated at 27°C. The heart rate, incubation period and hatchability of the embryos in each group were detected. The results showed that the overall hatchability and the hatchability after tracing the first grouping of eggs of group III were superior to other groups, while the hatchability of group IV after tracing the second group of eggs was also increased to a certain extent compared with groups I and II. The peak period of shelling in group I was 95~98 days, the peak period of shelling in group II was 63~64 days, and the time of shelling in groups III and IV was between I and II. The heart rate progression of the embryos from group I combined in groups III and IV was significantly faster than that of the initial group I, indicating that the embryos in Groups III and IV could influence each other, and it was speculated that the information exchange might promote the synchronous hatching of embryos with different development progress, which helps to reduce the rate of predation by natural enemies in the early stage of hatchling.

Keywords

The Red-Eared Slider Turtle, Hatching, Information Exchange, Heart Rate

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

胚胎时期是生命最脆弱的时期，早期认为胚胎只能被动地响应环境的变化。进一步的研究表明，胚胎具有主动响应环境变化的行为调节能力[1]。玛瑞曲颈龟(*Emydura macquarii*)的卵在沙子下未破壳而出时，上层靠近太阳晒热土壤的卵比下层较冷土壤处的卵要发育得快，但是这些发育中的胚胎能通过信息交流感知其它胚胎发育的进度，从而改变自身的步调，同步孵化[2]，达到躲避天敌捕食、维持种群数量的目的。无独有偶，类似于玛瑞曲颈龟的这类胚胎间的信息交流现象在绿海龟(*Chelonia mydas*) [3]、鸟类[4]中普遍存在。此外，绿海龟还会利用巢穴的深度所导致的温度梯度控制其后代雌雄比例，从而保证物种的延续能力。陆生龟类与海龟相比，其孵化的自然环境更加多样且复杂[5]，产卵频率及产卵量更低[6]，卵以及稚龟的天敌种类更多，从而导致众多陆生龟类处于濒危或极度濒危的状态。

目前，有关温度、湿度、光照等非生物因子影响稚龟健康状况的研究已取得大量成果。例如在相对较高的温度下(适宜范围内)，胚胎对卵黄的利用率[7]以及对卵壳中矿物质元素的摄取量[8]会相对较高，胚胎的发育进程加速[9]，稚龟的健康状况也会较好[7]。孵化湿度对稚龟的体重、个体大小及运动能力都有显著影响[10]。但是有关陆生龟胚胎信息交流这类生物因子对胚胎发育的影响未见报道。

因此，本实验从红耳龟的胚胎入手，通过对胚胎心率的测定及不同组龟卵孵化率的统计，以探究出陆生龟类胚胎个体间是否会互相影响，促进胚胎的发育进度达到同步孵化。为进一步研究陆生龟胚胎的

信息交流提供基础数据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

试验采用购自海口东山鸿旺水产养殖场的产于同一天的红耳龟卵 150 枚，龟卵的形态学指标没有显著性差异。在实验室短暂静置稳定后用于分组孵化。

2.2. 实验器材

SPS-250 智能生化培养箱购自宁波海曙赛福实验仪器厂；0~150 游标卡尺购自上海申韩量具有限公司；心率仪(NEWTON ABBOT-ENGLAND BUDDY01)；电子天平。

2.3. 实验方法

2.3.1. 分组孵化

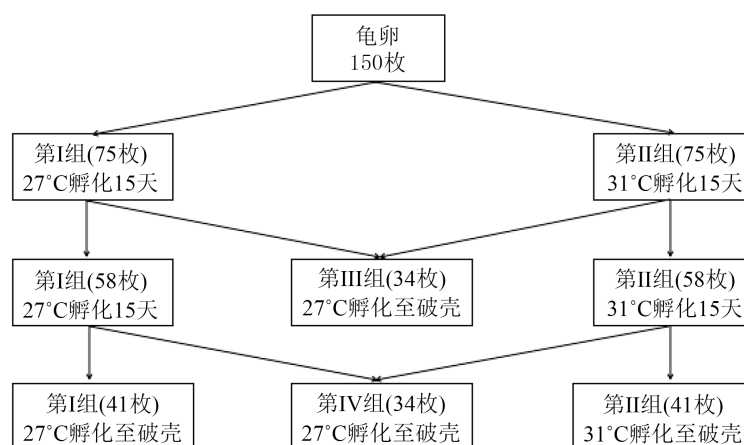


Figure 1. Schematic diagram of group incubation

图 1. 分组孵化示意图

如图 1 所示，将 150 枚龟卵随机均分为 I、II 两组(各 75 枚)，分别将 I 组和 II 组置于 27°C 和 31°C 的孵化箱中恒温孵化。15 d 后，从 I、II 组中各随机取 17 枚卵组合为第 III 组，将第 III 组(34 枚)放置于 27°C 的孵化箱中恒温孵化至破壳，I 组(58 枚)和 II 组(58 枚)组依旧分别放置于 27°C 和 31°C 的孵化箱中恒温孵化。

孵化 30 d 后，从 I、II 组中各随机取 17 枚卵组合为第 IV 组，将第 IV 组(34 枚)放置于 27°C 的孵化箱中恒温孵化出壳，I 组(41 枚)、II 组(41 枚)依旧分别放置于 27°C、31°C 的孵化箱中恒温孵化出壳，整个孵化期间严格控制四组的光线、湿度保持一致。

2.3.2. 胚胎心率测量

在胚胎孵化期间，每隔 15 天(理想状态下的四分之一孵化期)对所有胚胎的心率进行测量并统计。

3. 实验结果

3.1. 红耳龟受精卵孵化率

如表 1，通过对各组孵化率情况进行差异显著性分析可知，第 III 组总孵化率为 83.3%，显著高于其他各组；其中来自 I 组中的卵孵化率为 87.5%，与第 I 组相比具有差异显著性($P < 0.05$)，与第 IV 组中来

自第 I 组卵的孵化率无显著差异($P > 0.05$), 来自 II 中的卵孵化率为 78.5%, 显著高于第 II 组和第 IV 组中来自第 II 组卵的孵化率($P < 0.05$); 第 IV 组总孵化率为 58.6%, 其中来自 I, II 组中的卵孵化率分别为 75.0% 和 38.4%, 与第 I 组和第 II 组卵的孵化率无显著差异($P > 0.05$)。

Table 1. Statistics of hatching rate

表 1. 孵化率情况统计表

组别	入孵卵数 (n)	受精卵 (n)	出壳数 (n)	胚胎死亡 (n)	孵化率 (%)
第 I 组	41	35	23	12	65.7
第 II 组	41	33	10	23	30.3
第 III 组(I 组卵)	17	16	14	2	87.5
第 III 组(II 组卵)	17	14	11	3	78.5
第 IV 组(I 组卵)	17	16	12	4	75.0
第 IV 组(II 组卵)	17	13	5	8	38.4

Table 2. Statistics of specific shell-breaking time of juvenile tortoise

表 2. 稚龟具体破壳时间统计表

孵化期/d	第 I 组/(n)	第 II 组/(n)	第 III 组/(n)		第 IV 组/(n)	
			I 组卵	II 组卵	I 组卵	II 组卵
62	0	1	0	0	0	0
63	0	5	0	0	0	0
64	0	4	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0	1
73	0	0	0	0	1	3
76	0	0	0	3	0	0
78	0	0	0	4	0	0
79	0	0	0	1	0	0
80	0	0	1	1	0	0
81	0	0	2	1	0	1
82	0	0	1	1	0	0
83	0	0	3	0	1	0
84	0	0	1	0	2	0
85	0	0	2	0	1	0
86	0	0	1	0	0	0
87	0	0	2	0	1	0
88	0	0	1	0	0	0
90	2	0	0	0	2	0
92	3	0	0	0	4	0
93	1	0	0	0	0	0
94	2	0	0	0	0	0
95	7	0	0	0	0	0
97	2	0	0	0	0	0
98	4	0	0	0	0	0
102	2	0	0	0	0	0
合计	23	10	14	11	12	5

3.2. 红耳龟受精卵孵化期

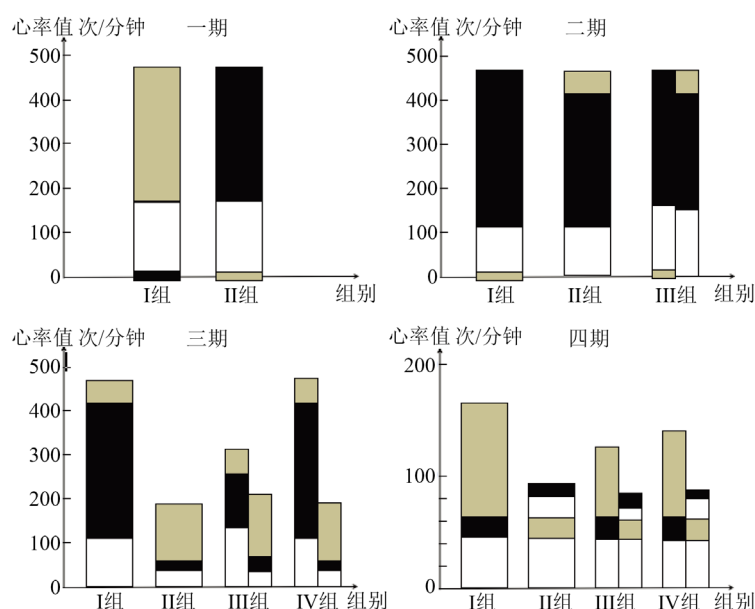
由表 2 可知,第 I 组的孵化期为第 90 至 102 天,其中第 95 至 98 天为孵化高峰期。第 II 组的孵化期为第 62 至 64 天,集中在第 63 和 64 两天出壳。第 III 组的孵化期为第 76 至 88 天。第 IV 组的孵化期为第 71 至 92 天,该期间破壳数量分布极为分散。通过比对 III、IV 组中各稚龟来源发现,第 III 组中来自 I 组卵的孵化期略短于第 I 组卵的孵化期,来自第 II 组卵的孵化期显著长于第 II 组卵的孵化期,同时,来自第 II 组的卵孵化期略短于来自第 I 组的卵,但其来自 I、II 的卵孵化期有一定的时间交叉。第 IV 组中来自第 I 组卵的孵化期略短于第 I 组卵,来自第 II 组卵的孵化期长于第 II 组卵,且显著短于来自第 I 组卵的孵化期,两者之间几乎不存在时间交叉。

3.3. 红耳龟受精卵心率检测

3.3.1. 心率值总体情况

在孵化期间多次进行心率值测量发现,可根据心率情况将胚胎发育进度人为地概括为五个阶段:

- ① 无心率阶段,该阶段心率值为 0 次/分(下面简称为“一阶段”);
- ② 心率值不断波动无法准确测量阶段(下面简称为“二阶段”),该阶段心率值在 100~500 次/分之间不断跳动,无定值,无法测量;
- ③ 心率值极高却稳定可测量阶段(下面简称“三阶段”),该阶段心率值稳定在 100~500 次/分之间的某一数值,可测量;
- ④ 心率值较低且稳定可测量阶段(下面简称“四阶段”),该阶段心率值稳定在 35~65 次/分之间的某一数值,可测量;
- ⑤ 心率值较高且稳定可测量阶段(下面简称“五阶段”),该阶段心率值稳定在 78~92 次/分钟之间的某一数值,可测量。



注: ① 图中颜色深浅代表该心率区间内胚胎数量的多少,颜色越深,胚胎数量越多。
② 第 III 组和第 IV 组的图分为两列,左列与右列分别表示该组中来自第 I 组和来自第 II 组的胚胎心率情况。

Figure 2. Changes of heart rate values in each group

图 2. 各组心率值变化情况图

3.3.2. 红耳龟胚胎心率值变化情况

若以时间为标准, 每 15 天作为一个区间, 可将胚胎的孵化时间分为四个时期(即一期, 二期, 三期, 四期分别对应孵化的第 1~15 天, 第 16~30 天, 第 31~45 天, 第 46~60 天)。结合图 2 以及 3.2.1 的内容可得出:

Table 3. Comparison of embryo development time and development stage
表 3. 胚胎发育时间与发育阶段对比表

组别	一期 (1~15 d)	二期 (16~30 d)	三期 (31~45 d)	四期 (46~60 d)
I 组	一阶段	二阶段	三阶段	四阶段
II 组	二阶段	三阶段	四阶段	五阶段
III 组(I 组卵)	/	二阶段	三阶段	四阶段
III 组(II 组卵)	/	三阶段	略低于四阶段	四五阶段间
IV 组(I 组卵)	/	/	三阶段	四阶段
IV 组(II 组卵)	/	/	四阶段	五阶段

Table 4. Statistics of heart rate values in each group
表 4. 各组心率值有无情况统计表

组别	一期	二期	三期	四期
第 I 组	10%	74%	73%	56%
第 II 组	48%	30%	43%	27%
第 III 组	/	79%	73%	73%
第 IV 组	/	/	50%	50%

由表 4 可知, 第 I 组中心率的胚胎占卵量百分比在一期极低, 二期显著升高, 三、四期接连有所降低, 但数据一直保持在中等偏上水平。第 II 组中心率的胚胎占卵量百分比在一期相对 I 组较高, 之后则波动降至极低水平。第 III 组中心率的胚胎占卵量百分比在二期极高, 三、四期略微下降但仍处于极高水平。第 IV 组中心率的胚胎占卵量百分比在三、四期无变化, 处于中等水平。

4. 分析与讨论

4.1. 红耳龟受精卵孵化率情况分析

从统计结果可知, 第 I 组和第 II 组受精卵孵化率都较低。据李新民[11]研究, 红耳龟最适孵化温度是 30℃~33℃, 此温度有利于红耳龟的胚胎发育; 而容银燕等[9]研究发现低温导致胚胎发育减缓或停滞而过高温度虽能提高胚胎发育速度但易对胚胎造成损伤, 导致其畸形和死亡。第 III 组受精卵因为前 1/4 期所处的环境不同, 虽然同是在 27℃ 环境下孵化, 整体孵化率高于 I、II 两组。Ricky-John Spencer [2] 在研究中发现, 玛瑞曲颈龟孵化过程中胚胎发育较快的受精卵, 可以释放一些信息因子刺激发育比较慢的胚胎, 加快胚胎发育的进度, 可能因此使整体的孵化率有所提高。

第 IV 组孵化率较低且来源不同的龟卵孵化率差距较大, 可能是由于受精卵混合时间较晚, 胚胎间相互影响程度降低, 前期孵化温度成为影响孵化率的主要因素[5], 因此来自 I、II 组卵的孵化率比较接近第 I 组和第 II 组的孵化率。

4.2. 红耳龟受精卵孵化期变化分析

实验结果可知, 第 II 组卵破壳用时远短于其他组。而第 I 组卵破壳用时最长, 说明在一定范围内,

高温会使胚胎发育速度加快[10]。

第 III 组卵整体集中在第 76 至 88 天破壳,且来自第 I、II 组的卵的孵化期有所重合,研究报道孵化期胚胎之间存在信息交流和能量交换[12],如果通过分散能量的热传导方式不可能导致个别来自低温组的卵孵化进度领先,且由于混合时间较早,热传导所分散的能量带来的影响极小。因此,推测发育较快的胚胎与发育较慢的胚胎混合孵化时,发育快的胚胎通过某种生物信号刺激发育慢的胚胎,加快其发育速度,从而趋于同步孵化。

第 IV 组卵孵化期跨度较长,且中间多处有明显间隔。其中来自第 II 组的卵由于受到孵化温度的影响,孵化时长明显长于第 II 组。来自第 I 组的卵整体领先于第 I 组可能是因为来自第 II 组的胚胎通过释放生物信号加速了其整体的发育速度[12]。

4.3. 红耳龟胚胎发育期心率值总体变化趋势分析

研究报道鸟类和海龟受精卵孵化时,不同时期心率有不同的特点,心率值直接反映胚胎发育的进度[13]。通过心率检测结果可见,红耳龟胚胎心率呈现阶段性变化,推测不同阶段心率变化的原因:

一阶段:在孵化初期,胚胎进入有丝分裂,还未分化出心脏,因此在使用心率仪测定心率时无法测出心率值;二阶段:卵内发育出心脏,产生了心率,但此时的心脏自律性较差,受外界刺激高度敏感,因此在测量过程中心率值会不断波动无法准确测量;三阶段:神经系统发育不完全,胚胎新陈代谢旺盛,心脏自律性很高;四阶段:在神经系统的调控下胚胎心率逐渐趋于正常龟类心率值;五阶段:孵化末期,稚龟即将破壳,短时间内需要消耗较多的营养物质提供能量破壳,心率值又有所偏高。

4.4. 受精卵心率变化分析

从实验结果可知,第 I 组胚胎心率出现较晚,而第 II 组心率出现的较早。耿军[14]的研究认为高温能够增加幼体心率从而缩短孵化期,因此第 I 组心率出现较第 II 组晚,可能是所处的孵化环境温度较低,胚胎发育的进度较第 II 组慢。

从表 3 可知,第 III 组从二期始,其中来自第 II 组胚胎心率的五个阶段明显降速,最终与来自第 I 组胚胎的进度几乎相同,可能是因为孵化温度的降低。徐意[15]在荒漠沙蜥(*Phrynocephalus przewalskii*)胚胎的研究中及 Birchard G F 等[16]在拟鳄龟(*Chelydra serpentina*)的研究中也得到了相同结论,即环境温度升高会导致胚胎心率加快。来自第 I 组胚胎心率的五个阶段有所提速,相比于第 I 组的胚胎更快地进入了四阶段,孵化期比第 I 组孵化期有所缩短。提速的原因可能主要是来自高温组的胚胎所产生的信号加速了低温组胚胎的发育进度。在玛瑞曲颈龟的研究中 Mcglashan JK [12]认为不同发育进程胚胎间的气体信号交换,促进了发育较慢的胚胎的新陈代谢,从而使两者达到同步孵化。第 IV 组从三期开始,其中来自第 I 组胚胎心率整体的进度几乎没有变化,在四期之后才有所提速,只有极少数个体心率值向五阶段加速发育较为明显,可能是与第 I 组的胚胎发育进度差距过大,变化不明显。

从统计结果来看,各组稚龟的孵化时长与其心率值情况完全契合,说明心率值直接用于反映胚胎发育进度在红耳龟上有较高的可靠性。若准确地将心率值情况与孵化时间相匹配,在日后的龟类研究及养殖中,可通过较为简便的心率测量方法确定龟类所处的发育阶段,及时调整孵化环境,从而一定程度控制龟类胚胎的生长发育。

通过各项指标检测,认为在陆生龟胚胎发育过程中,可能也存在信息交流,可使不同发育进程中的胚胎趋于同步,从而提高了稚龟破壳时的存活率,对于维系物种繁衍和进化起到了重要作用。

参考文献

- [1] 赵波,杜卫国.卵生脊椎动物胚胎对环境变化的行为响应[J].中国科学,2016,46(1):103-112.

<https://doi.org/10.1360/N052015-00220>

- [2] Spencer, R.-J., Thompson, M.B. and Banks, P.B. (2001) Hatch or Wait? A Dilemma in Reptilian Incubation. *Oikos*, **93**, 401-406. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.930305.x>
- [3] 陈华灵, 叶明彬, 林日锦, 古河祥, 夏中荣. 海龟卵人工移植试验[J]. 四川动物, 2007, 26(2): 456-457.
- [4] 赵亮, 李来兴, 张晓爱. 两种雀形目鸟类孵化行为对子代质量的影响[J]. 动物学研究, 2002, 23(1): 25-30.
- [5] 吴建军. 巴西彩龟繁殖生物学、孵化环境及稚龟生长的研究[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2003.
- [6] 朱新平, 陈永乐, 魏成清, 刘毅辉, 黄善衔, 陈炎星. 人工饲养对黄喉拟水龟繁殖力的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 52-54.
- [7] 杨振才, 牛翠娟, 孙儒泳. 温度对中华鳖卵孵化和胚胎发育的影响[J]. 动物学报, 2002, 48(6): 716-724.
- [8] 郑荣泉, 杜卫国, 张永普, 鲍毅新. 孵化温度对乌龟胚胎能量利用及矿物质代谢的影响[J]. 动物学报, 2006, 52(1): 21-27.
- [9] 容银燕, 凌兰, 傅丽容, 史海涛. 温度对中华条颈龟孵化和性别的影响[J]. 水产科学, 2014, 33(6): 385-388.
- [10] 赵波. 孵化温湿度及局部低氧对龟鳖目动物胚胎心率的影响[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 杭州师范大学, 2011.
- [11] 李新民. 红耳龟人工繁殖与育苗试验[J]. 水利渔业, 2005, 25(4): 39-40.
- [12] Mcglashan, J.K., Spencer, R.J. and Old, J.M. (2012) Embryonic Communication in the Nest: Metabolic Responses of Reptilian Embryos to Developmental Rates of Siblings. *Proceeding of the Royal Society B Biological Sciences*, **279**, 1709-1715. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2074>
- [13] 陈敏, 王龙舞, 杨灿朝, 等. 广西弄岗家燕种群的卵胚胎心率[J]. 四川动物, 2016, 35(1): 93-96.
- [14] 耿军. 不同温度效应下红耳龟与乌龟幼体表型、生理与功能的比较[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 杭州师范大学, 2017.
- [15] 徐意. 荒漠沙蜥胚胎及成体的代谢率和心率的温度适应性[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 兰州大学, 2012.
- [16] Birchard, G.F. and Reiber, C.L. (1996) Heart Rate during Development in the Turtle Embryo: Effect of Temperature. *Journal of Comparative Physiology B*, **166**, 461-466. <https://doi.org/10.1007/BF02338288>